

# UE 11 : Génétique

## Tut'Rentrée 2017

### I. Introduction

En génétique médicale, notre but est de faire un diagnostic pré-natal de maladies. Pour faire cette analyse, on va étudier les acides nucléiques.

- **ADN dans 95% des cas** / ARN → rare car très instable
- Les échantillons sont de **très faible quantité** (quelques microgrammes) et toujours à partir de **cellules nucléées** ++++
  - o Donc **jamais à partir de GR**

### II. Principales techniques d'analyse moléculaire

#### A. Extraction de l'ADN et de l'ARN

ADN	1) Prélèvement de sang <b>sous EDTA</b> (Anticoagulant) - <u>Jamais avec de l'héparine</u> +++ 2) <b>Lyse des GR</b> avec une solution Hypotonique - Car ici ce sont les GB qui nous intéresse ++ 3) Récupération des GB dans une <b>solution de protéinase K</b> - Ici le but est de détruire les protéines entourant l'ADN 4) Extraction au <b>phénol-chloroforme</b> 5) Précipitation de l'ADN par <b>l'éthanol à froid</b>
ARN	Il est <b>beaucoup plus difficile à étudier car très instable</b> ++ - Instable veut dire qu'il est très sensible aux RNAses L'ARN est très peu utilisé en diagnostic de routine mais plutôt pour étudier l'expression d'un gène +++

#### B. Amplification par PCR.

Une fois notre ADN en petite quantité obtenue, on va l'amplifier pour obtenir en grande quantité.

Cette amplification est **spécifique, très sensible** et possède un fort risque de **contamination** +++

- C'est pour cela que les étapes se déroulent dans **un circuit monodirectionnel**

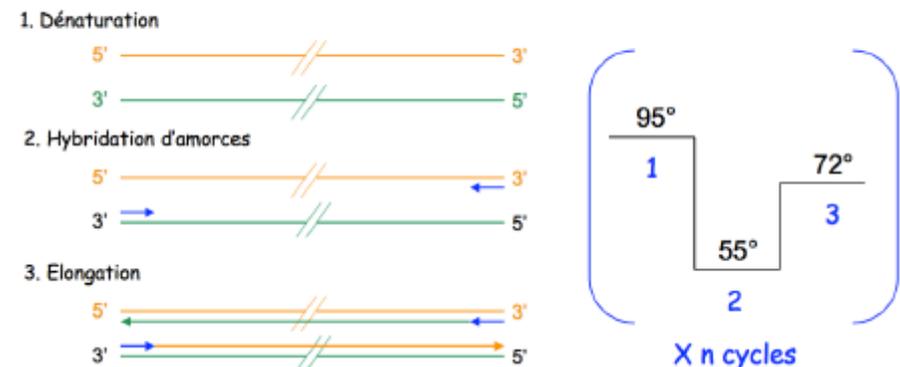
Prérequis : ADN du patient, Amorce, dNTP, tampon MgCl<sub>2</sub>, Taq Polymérase

- La **Taq Polymérase** est une ADN polymérase **d'origine bactérienne** et **résistante à la chaleur**.
- Il est nécessaire de connaître également les **bornes d'amont et d'aval** de la région à étudier (18-20 nucléotides)

Déroulement de l'amplification : cycle de 3 étapes se déroulant aussi longtemps que nécessaire.

- Au bout de n cycles, on aura 2<sup>n</sup> ADN

**DENATURATION → HYBRIDATION → ELONGATION ♡**



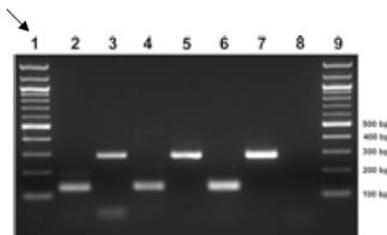
### C. Electrophorèse sur gel.

Une fois notre PCR effectuée, on va s'assurer qu'il n'y a pas eu de contamination.

Déroulement :

- Séparation des molécules d'ADN en fonction de leur taille sur gel d'agarose ou d'acrylamide
- La migration s'effectue **du - vers +**
- Une fois la migration terminée, on effectue une **coloration au bromure d'éthidium (BET)** que l'on visualisera **sous lumière UV**.

Marqueur de poids moléculaire



## III. Recherche d'une mutation ciblée.

### A. Cas de l'Achondroplasie.

- C'est la plus fréquente des chondroplasies (1/15 000)
- Le diagnostic est évoquée par **signe d'appel échographique = « fémurs courts »**
- C'est une maladie de **transmission autosomique dominante**
- **90% des cas → mutation de novo**
- Forme **plus grave → atteinte chez un homozygote** pour la mutation

Caractéristiques :

- Petite taille
- Membres courts
- Hyperlordose
- Mains courtes
- Macrocéphalie
- Front haut
- Ensellure nasale marquée
- **Intelligence normale ++**
- Complications neurologiques (myélopathie)



Gène responsable : FGFR3 → code pour un **récepteur de croissance fibroblastique** et va causer dans la maladie une anomalie de formation du cartilage.

- La mutation sera **toujours située au même endroit**

Comment dépister une achondroplasie devant un signe d'appel échographique ?

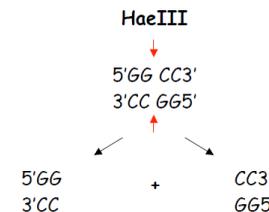
- 1. Extraction de l'ADN
- 2. Amplification par PCR
- 3. Vérification par électrophorèse
- 4. Digestion enzymatique

### D. Digestion enzymatique.

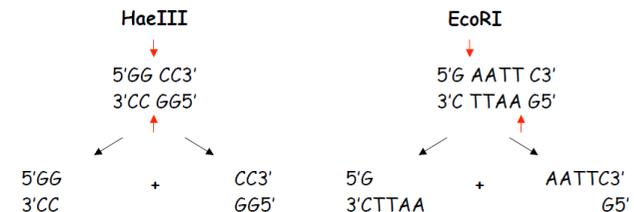
Pour la digestion enzymatique, on utilise :

- **Enzymes de restrictions de type II = ENDOnucléase bactérienne**
  - Cette enzyme provoque la **coupure spécifique** et **reproductible** de l'ADN double brin
  - L'enzyme reconnaît une séquence dite « **palindromique** » (*cad qui se lit dans les 2 sens comme le mot « KAYAK » ou « ANNA »*).
  - La digestion (ou coupure) peut être à **bout franc** ou **cohésif**

Coupages à bouts francs  
(blunt ends)



Coupages à bouts cohésifs  
(sticky ends)



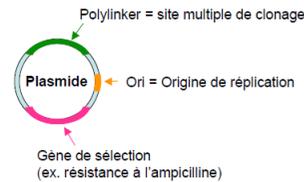
## IV. Séquençage de l'ADN.

Le but du séquençage de l'ADN est de déterminer la succession de nucléotides composant l'ADN afin de vérifier un diagnostic.



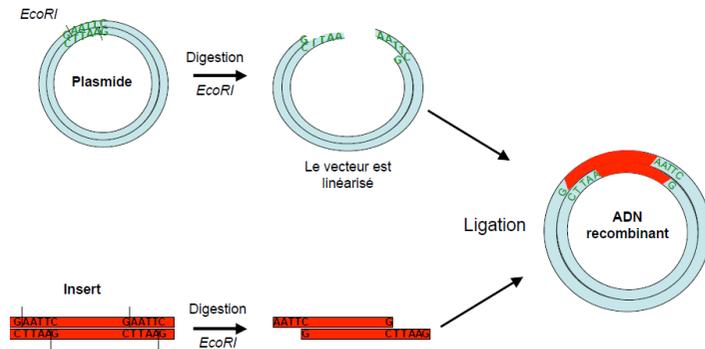
Qu'est-ce qu'un plasmide ? C'est le vecteur une fois qu'il a été recombiné

- **Polylinker** : site multiple de clonage
- **Origine de répliation** : permet au plasmide de se multiplier indépendamment de la bactérie
- **Gène de sélection** : gène de résistance à un ATB (Antibiotique)



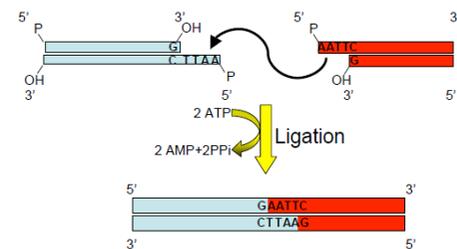
**1. Préparation du vecteur et de l'insert.**

- Digestion par des **enzymes de restriction**



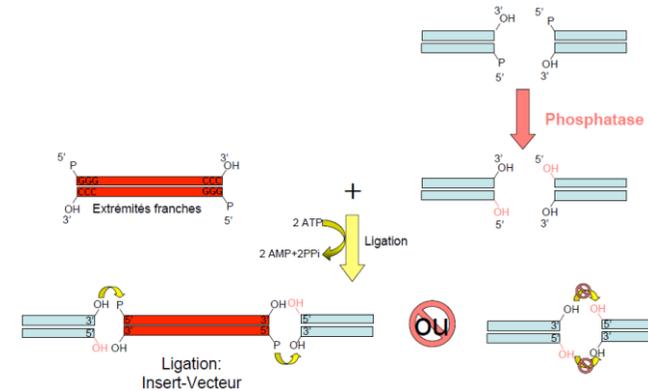
**2. Ligation du vecteur et de l'insert**

On va utiliser une enzyme formant une liaison phosphodiester = **T4 DNA ligase**.



Problème : la ligase peut refermer le vecteur **avec ou sans insert**.

- Solution : une **étape de déphosphorylation va être nécessaire** via l'utilisation d'une phosphatase qui va générer des extrémités franches.

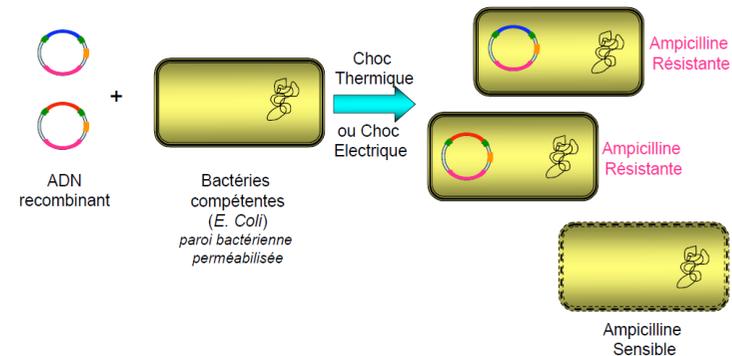


**B. Introduction du vecteur dans la bactérie hôte.**

**1. Transformation bactérienne.**

Pour que le plasmide rentre dans la bactérie, il va falloir **perméabiliser la membrane** via un **choc thermique, électrique ou chimique**.

- Au final chaque bactérie possèdera 1 ADN recombinant
  - Mais **Attention ! Il est possible de trouver des bactéries ne possédant pas d'ADN recombinant.**



### C. Sélection et amplification des clones bactériens.

Dans une boîte de pétri contenant de la **gélose** et un **antibiotique**, on va étaler les bactéries.

- Grâce à l'antibiotique, on va pouvoir séparer les bactéries ayant intégré l'ADN recombinant des autres. *Pourquoi ?*

Parce que sur l'ADN recombinant, on trouve un gène de résistance aux antibiotiques.

- Ainsi les bactéries ayant intégrés l'insert vont survivre.

**Problème** : il n'y a **jamais 100% des vecteurs qui auront intégrés l'insert**

- **Solution** : **Sélection blanc / bleu.**

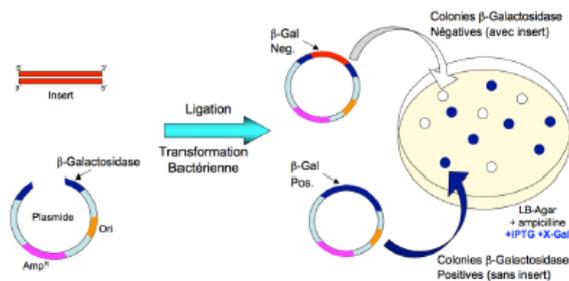
#### 1. La Sélection blanc/bleu.

Lorsque l'insert est présent, il s'insère pile au niveau d'un gène codant pour la bêta-galactosidase.

- Le gène codant pour la galactosidase va colorer la bactérie en bleu

Ainsi quand l'insert est présent, il empêche l'expression de la B-galactosidase et la bactérie reste blanche.

AVEC INSERT	SANS INSERT
Gène $\beta$ -Galactosidase <b>inactivé</b>	Gène $\beta$ -Galactosidase <b>fonctionnel</b>
X-Gal incolore <b>non hydrolysé</b>	X-Gal hydrolysé colorant le milieu <b>en bleu</b>
<b>COLONIES BLANCHES</b>	<b>COLONIES BLEUES</b>



### D. Amplification des clones bactériens.

Chaque colonie va être mise en culture dans un milieu de culture adapté à la croissance bactérienne, toujours en présence d'antibiotique.

- Une fois la croissance terminée, on récupère l'ADN et on le séquence.

